

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-81226

⑤ Int.Cl.⁴G 01 J 3/02
3/427

識別記号

庁内整理番号

C-7172-2G
M-7172-2G

④ 公開 昭和63年(1988)4月12日

審査請求 未請求 発明の数 3 (全15頁)

⑭ 発明の名称 スペクトル分析方法及び装置

⑯ 特 願 昭62-184701

⑰ 出 願 昭62(1987)7月25日

優先権主張 ⑱ 1986年7月25日 ⑲ イギリス(GB) ⑳ 8618159

⑲ 発 明 者 クレーグ ジョージ イギリス国、ハートフォードシャー エスジー 6 4 エー
ソーヤーズ イー、レッチワース、イクニールド ウエイ、エル96

⑲ 発 明 者 ローレンス ジョン イギリス国、ハートフォードシャー、ロイストン、リトリ
ロビンソン ングトン、シルバー ストリート 7

⑲ 出 願 人 アレス-セロノ・リサ アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02109、ボストン、
ーチ アンド デイベー サーティーセブンス フロアー、エクステンジ プレー
ロブメント リミティ ス(番地なし)
ド パートナーシップ

⑲ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外5名

明細書の浄書(内容に変更なし)
明 細 書

1. 発明の名称

スペクトル分析方法及び装置

2. 特許請求の範囲

1. 反射構造を多色光のビームである傾斜角をもって照明する過程と、反射光のスペクトルを分析する過程とから成る反射構造から反射される光のスペクトルを分析する方法において、反射構造と多色光のビームとが成す角度の変動が分析結果に及ぼす影響を最小とするように方法を実施することを特徴とする方法。

2. それぞれ、少なくとも1つの既知のスペクトル特性を有する1本又は複数本の光の基準ビームを発生するために又は前記多色光のビームに少なくとも1つの既知のスペクトル特性を与えるために少なくとも1つの光源が使用され、前記既知のスペクトル特性は、前記変動の影響を最小にすることができるようなものである特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 前記少なくとも1つの既知のスペクトル特

性は 700から850nm の範囲の良好な吸収ノッチパターンである特許請求の範囲第2項記載の方法。

4. 前記1本又は複数本の基準ビームは、反射構造が基準ビームのスペクトルに影響を及ぼさないように偏光される特許請求の範囲第2項又は第3項のいずれか記載の方法。

5. 反射光は、分析に先立って、前記変動の影響を最小にすることができるように構成され且つ配置される分散光学素子により受容される特許請求の範囲第1項から第4項のいずれか1項に記載の方法。

6. 前記分散光学素子はブレースされた回折格子である特許請求の範囲第5項記載の方法。

7. 前記反射構造は回折格子である特許請求の範囲第1項から第6項のいずれか1項に記載の方法。

8. 前記反射構造には生物学的に活性である材料が直接に又は間接的に結合又は吸着されている特許請求の範囲第1項から第7項のいずれか1項に記載の方法。

9. 多色光の偏光ビームが使用され、偏光の方向は、反射構造が反射光のスペクトルに最大の影響を与えるようなものである特許請求の範囲第1項から第8項のいずれか1項に記載の方法。

10. (i) 多色光のビームを発生することができる光源と；(ii) 使用中に、多色光のビームを反射構造にある傾斜角をもって供給する手段と；(iii) 使用中に、反射光のスペクトルを分析する分析手段と；(iv) 使用中に、反射構造と多色光のビームとが成す角度の変動が分析手段の出力に及ぼす影響を最小にする手段とを具備する装置。

11. 前記変動の影響を最小にする手段は、それぞれ、少なくとも1つの既知のスペクトル特性を有する1本又は複数本の光の基準ビームを発生することができるか又は前記多色光のビームに少なくとも1つの既知のスペクトル特性を与えることができる1つの又は複数の光源から構成され、既知のスペクトル特性は、前記変動の影響を最小にすることができるように装置の校正を可能にするようなものである特許請求の範囲第10項記載の

装置。

12. 前記少なくとも1つの既知のスペクトル特性として、700から850nmの範囲の良好な吸収ノッチパターンを発生する手段を含む特許請求の範囲第11項記載の装置。

13. 前記吸収の良いノッチパターンを発生する手段は希土類が添加された結晶(クリスタル)である特許請求の範囲第12項記載の装置。

14. 前記変動の影響を最小にする手段は、前記変動の影響が最小となるように構成され且つ配置される分散光学素子から構成される特許請求の範囲第10項記載の装置。

15. 分散光学素子はブレースされた回折格子である特許請求の範囲第14項記載の装置。

16. 多色光のビームを供給する手段は回折制限平行ビームを供給する手段から構成される特許請求の範囲第9項から第15項のいずれか1項に記載の装置。

17. 分析手段は多素子線形感光アレイから構成される特許請求の範囲第10項から第16項のい

ずれか1項に記載の装置。

18. 前記多素子線形感光アレイに沿った素子位置における照度のレベルを測定するために前記多素子線形感光アレイを走査し且つ問合せる手段を具備する特許請求の範囲第17項記載の装置。

19. 1) 少なくとも λ_1 から λ_2 までの連続する波長スペクトルを有する偏光されたビームを発生する光源と；

2) 試験すべき反射回折格子に入射する直径の小さい回折制限平行ビームを発生する第1のレンズ手段と；

3) 反射回折格子により反射された光を受容するブレースされた回折格子と；

4) ブレースされた回折格子により反射される光のそれぞれの成分の波長が線形フォトダイオードアレイに沿ったその位置を決定し、且つアレイの長さが2つの波長 λ_1 及び λ_2 により決定される位置の範囲を十分に包含するように反射光を多素子線形フォトダイオードアレイに集束する第2のレンズ手段と；

5) 反射回折格子の異なる領域を反射面として作用させるために、光ビームと反射回折格子との間に相対運動を成立させる手段と；

を具備し、反射回折格子の吸収波長 λ_1 は λ_1 から λ_2 の範囲内にあるため、波長 λ_1 の光はブレースされた回折格子に入射する光には含まれておらず、従って、直線フォトダイオードアレイに入射する光のスペクトルにも含まれておらず、1つ又は複数のフォトダイオードは光を受容せず、線形フォトダイオードアレイのそれぞれの素子の信号出力を決定することにより、どの素子に光が入射されていないかを検出し、校正により、反射回折格子の表面で吸収された光の波長を決定する手段が設けられる、反射回折格子の表面における材料の薄い被覆膜の有無を検出する装置。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は分光計に関し、特に、起こりうる誤差を補正することができるように分光計を使用する方法及びそのような方法を実施するための装置に

関する。

(従来の技術及び発明が解決しようとする問題点)

回折格子のような反射構造が、条件によっては、狭い波長範囲にある光の大半を吸収できることは知られている。最大吸収ノッチが起こる波長は格子の溝のピッチ、深さ及び形状により決定されると共に、格子表面に存在する被覆膜によっても影響を受ける。すなわち、たとえば、格子の表面に配位子と結合することができる生物学的に鋭敏な材料又はその他の材料が存在する場合、表面の第1の領域を基準領域(すなわち、 λ_0 の吸収波長を有する)として残し、別の領域を配位子を含有する液体サンプルで処理すると、配位子と格子表面の鋭敏な材料との結合により形成される錯体は、試験領域の吸収波長を λ_1 から λ_2 へシフトさせる。

原則として、これは、試験すべき反射構造を多色光のビームである傾斜角をもって照明する過程と、反射光のスペクトルを(たとえば、反射光を

多素子線形感光アレイに入射させることにより)分析する過程と、基準測定値と比較して、反射構造により吸収される光の波長のシフトが起こったか否かを判定する過程とを含む手順により、サンプルを配位子の有無に関して試験する方法を提供する。

しかしながら、反射構造により吸収される波長は反射構造の性質により(たとえば、反射構造が回折格子である場合は、格子の溝の間隔及び深さにより)決定されるばかりでなく、反射構造に対する光の入射角によっても決定される。入射角は反射構造のビームに対する相対運動によって変動すると考えられ、そのために誤差が生じるおそれがある。

(問題点を解決するための手段)

最も広い意味では、本発明は、反射構造を多色光のビームである傾斜角をもって照明する過程と、反射光のスペクトルを分析する過程とから成る反射構造から反射される光のスペクトルを分析する

方法において、反射構造と多色光のビームとが成す角度の変動が分析結果に及ぼす影響を最小とするようにその方法を実施することを特徴とする方法を提供する。

本発明は、(i)多色光のビームを発生することができる光源と；(ii)使用中に、多色光のビームを反射構造にある傾斜角をもって供給する手段と；(iii)使用中に、反射光のスペクトルを分析する分析手段と；(iv)使用中に、反射構造と多色光のビームとが成す角度の変動が分析手段の出力に及ぼす影響を最小にする手段とを具備する装置をさらに提供する。

多色光のビームは回折制限平行ビームであり且つ偏光されるのが好ましい。

本発明の一実施例によれば、反射構造と多色光のビームとが成す角度の変動が分析手段の出力に及ぼす影響は、多色光のビームに少なくとも1つの既知のスペクトル特性を与えることにより最小限に抑えられる。あるいは、それぞれ、少なくとも1つの既知のスペクトル特性を有する1本又は

複数本の光の基準ビームを供給しても良い。既知のスペクトル特性は使用される装置の校正を可能にするようなものである。

たとえば、試験領域及び基準領域を含む反射格子の表面プラズモン共鳴により影響を受けないように、第1の光ビームの偏光平面に対して垂直に偏光された回折格子平行ビームを発生する光源を採用しても良い。第2の光源は、反射格子に入射するスペクトルに既知の校正特徴を導入するために使用される。これは光源自体の特性であっても良く、また、光源と波長選択素子との組合せから得られても良い。ダイオードアレイに形成される校正特徴の像は、システムを試験領域と基準領域の双方で波長校正するのに十分な情報を提供する。

第2の光源からのスペクトルが λ_1 から λ_2 の範囲でいくつかの校正特徴を有する場合、感光素子ごとの波長に関してスケール因子を設定することができる。

校正用の第2の光源を使用することにより、装置の機械的許容差に対する制限をかなり緩和する

ことができる。

光源は発光ダイオード(LED)、レーザー光源又は白熱電球であれば良い。

LEDを使用する場合は、第2の発光ダイオードからの光がネオジムが添加されたイットリウムアルミニウムガーネット(NdYAG)等の希土類が添加された結晶又は干渉フィルタを通過するように構成するのが好ましく、これにより、700から850nmの良好なノッチパターンが発生される。

NdYAGを使用する場合、発光ダイオード範囲中央の波長をほぼ775nmとする700nmから850nmの範囲の連続する波長帯域にある光を発するのが好ましい。

本発明の別の実施例によれば、反射構造と多色光ビームとが成す角度の変動が分析手段の出力に及ぼす影響は、分析に先立って反射光を適切に構成され且つ配置された分散光学素子、たとえばブレイズされた回折格子に入射させることにより最小限に抑えられる。分散光学素子は、反射構造の角度向きの変動を厳密に補償するように構成され

且つ配置されるのが理想的である。実際には、分散光学素子は、特定の波長で補償が正確となるように構成され且つ配置される。このようにすれば、隣接する波長で変動の影響は最小になる。

反射構造は、ポリカーボネート基板の表面に複数の溝から成る回折格子パターンが型押し又はその他の方法により形成され、それらの溝が金、銀、アルミニウム等の薄く軽量の反射被膜により被覆されている回折格子であるのが好ましい。溝の線間隔と深さは、表面に700から850nmの範囲の吸収波長を与えるように選択される。

反射構造の上面には、配位子(たとえば抗原又は抗体)と結合することができる材料の薄い層が形成されていても良く、これにより、試験すべきサンプルを問題の配位子の有無又はその他に関して検出することが可能になる。反射構造の表面の1つの領域は基準領域として残されても良い。この場合、サンプルは表面の別の領域に塗布される。

サンプル中に配位子が存在する場合、配位子は反射構造上に存在する対応する材料と結合するこ

とになる。サンプル中に配位子が存在しなければ、試験領域は基準領域と同じ特性を有し、基準領域から試験領域に変わったときも、吸収ノッチの位置が著しく変化することはないはずである。

これに対し、サンプル中に配位子が存在する場合には、サンプル中の配位子の一部は反射構造上の対応する結合材料に付着し、その結果、試験領域の表面パラメータが基準領域に対して変化するために吸収ノッチの位置のシフトが起こるので、このシフトを検出すれば良い。

前述のように、反射光のスペクトルは、反射光を多素子線形感光アレイに集束することにより試験されれば良く、反射光のそれぞれの成分の波長はアレイに沿ったその位置を決定する。そのような場合、装置は、照度レベルを決定するために感光アレイを走査し且つ問合せる電気回路手段と、走査のスタート位置からの素子の数をカウントする手段と、最終像におけるノッチの絶対位置又は反射格子の基準位置と試験位置とに関するノッチ位置のシフトを記録及び/又は表示する手段とを

さらに具備するのが好ましい。

通常、ビームスプリッタを使用して、2つの光源を1本の光路に組合せている。

(実施例)

以下、添付の図面を参照して本発明を詳細に説明する。

第1図において、約775nmを中心として約100nmの帯域幅を有する発光ダイオード10は、偏光装置12を介して、ピンホール開口16を照明する第1のレンズ14に光を供給する。ピンホール開口16は、長手方向が後述する回折格子の格子線と平行であるスリットであっても良い。

レンズ18は、開口20との組合せにより、22で示される直径3mmの回折制限平行ビームを発生する。

このビームは反射回折格子24に向けられる。反射回折格子24は、ある種の生化学生成物が存在するところでは反射回折格子24の表面パラメータを変化させるような生物学的に活性の被覆膜

をその表面に有する。このように、反射回折格子24の表面は、単クローン抗体等の特定の抗体の層を支持しているか、又は特定の抗原の層を支持していれば良い。格子の表面に抗体材料がある場合は、格子の表面の一部に塗布される液体サンプルの中に対応する抗原が存在すると、抗原はサンプルが塗布されている格子の表面にある抗体と結合する結果になり、それにより、その領域における格子表面の表面特性が変化する。

図示されていないが、反射回折格子24を、まず、基準領域（すなわち、未処理領域）を回折制限平行ビーム22にさらし、続いて処理領域をビームにさらすように移動させる手段が設けられる。

被覆された反射回折格子24により反射された光は、ブレースされた回折格子26と、フォトダイオード30の線形アレイ上に像を形成する第3のレンズ28とにより分析される。

通常、アレイは、それぞれ約2.5マイクロメートル×2.5mmの大きさの素子を256個有する。

1mmにつき800本の線を有するブレースされた回折格子と、焦点距離が75mmであるレンズ28とを使用すると、フォトダイオード30のアレイの256個の素子全体について100nmの波長範囲を得ることができる。

約800nmを中心として、100nmを越える周波帯にわたる光がブレースされた回折格子30に入射すれば、全てのフォトダイオードが照明されることになる。

装置は、まず、反射回折格子24の基準領域に関して、次に、処理領域に関して、サンプルを塗布し、その結果、抗体と抗原との結合が起こったと思われる後の吸収の有無とその位置を決定し、それにより、結合及びその結果として起こる反射回折格子24の表面上の材料の堆積が原因となって発生するシフトの範囲を決定することを目的とする。

図示されていないが、アレイのスタート位置に関するスペクトル最小値の位置を決定することにより、校正後に、ノッチの正確な波長の決定を

可能にするために、フォトダイオードに入射する光の有無を示す電気信号を取出し、カウント及び曲線のあてはめ等により処理することができるように、フォトダイオード30のアレイに関連する走査検出回路が設けられる。

フォトダイオード30のアレイ中のノッチ（存在する場合）の正確な位置は、反射回折格子24の表面のパラメータにより決定されるのみならず、回折制限平行ビーム22の反射回折格子24への入射角によっても決定される。ビームを、まず、回折格子の基準領域に入射させ、次に回折格子の処理領域に入射させるように、ビーム又は回折格子のいずれか一方を他方に対して移動させることが必要であるので、処理領域が所定位置にあるときの反射回折格子24の向きと、基準領域が所定位置にあるときの反射回折格子の向きとが異なってしまう可能性は大いにあることがわかるであろう。

この問題を解決するために、反射回折格子24における向きの変化が比較的小さいならば、その

変化を補償するようにブレースされた回折格子26のパラメータを設定しても良い。この場合、通常の状況の下では、反射回折格子24の基準領域と処理領域との間で起こる唯一のシフトは、抗体と抗原との結合に起因して処理領域に材料が堆積することによるものであるもので、フォトダイオード30のアレイから絶対読取りを得るために、第1図に示されるような装置を校正することができる。

多色光のビームと反射回折格子24との角度の変化が分光計の出力に及ぼす影響をできる限り少なくするために必要とされるブレースされた回折格子26のパラメータは次のように計算されれば良い（第7図を参照）。

波長 λ の光が垂線に対して角度 θ を成して反射回折格子24に入射するものとする。この光は反射回折格子24から反射されて、ブレースされた回折格子26に角度 α で入射する。ブレースされた回折格子26から反射された光は、ブレースされた回折格子26の垂線に対して角度 θ を成し

て第2のレンズ28に向かう。次に、光は第3のレンズ28により、フォトダイオードアレイ30上のレンズの28の主軸から距離xの1点に集束される。第7図に示される光学系の特徴を表わすために使用されるパラメータは次の通りである：

D_0 : 反射回折格子24の周期数

D : ブレーズされた回折格子26の周期数

θ : ブレーズされた回折格子26の垂線と、この格子から反射される光とが成す角度

θ_0 : ブレーズされた回折格子26の垂線と、第3のレンズ28の主軸とが成す、 θ と同じ方向で測定した角度

f : 第3のレンズ28の焦点距離

C : 反射回折格子24に対するSPRの効果を表わし、たとえば、粒子の薄層の結合などにより反射回折格子24の性質が変化した場合に定数

r : 入射光ビームと、ブレーズされた回折格子26の平面とが成す角度

λ が SPR を励起するような値であれば、

$$\lambda / D_0 = \sin \beta = C \quad \text{式1}$$

ブレーズされた回折格子26の一次分散作用は、

$$D(\sin \theta + \sin \alpha) = \lambda \quad \text{式2}$$

により表わされる。フォトダイオード30のアレイは第3のレンズ28の焦点面にあるので、

$$x = f \tan(\theta - \theta_0) \quad \text{式3}$$

反射回折格子24に対する入射光ビームの方向と、ブレーズされた回折格子26の向きは共に一定であり、従って、第7図の三角形XYZから、

$$r + 2\beta + \pi/2 - \alpha = \pi \quad \text{式4}$$

$$\alpha = 2\beta + r - \pi/2$$

であることがわかる。変化の影響を最小限に抑えるためには、

$$dx/d\beta = dx/d\theta \cdot d\theta/d\beta = 0 \quad \text{式5}$$

となるように格子のパラメータを設定しなければならない。式3を θ で微分すると、

$$dx/d\theta = f \sec^2(\theta - \theta_0) \quad \text{式6}$$

式1及び2は、

$$D(\sin \theta + \sin \alpha) = D_0(C + \sin \beta)$$

$$\sin \theta = D_0/D(C + \sin \beta) - \sin \alpha \quad \text{式7}$$

であることを示唆する。式4及び7は、

$$\sin \theta = D_0/D(C + \sin \beta) - \sin(2\beta + r - \pi/2) \quad \text{式8}$$

であることを示唆する。式8を β で微分すると、

$$\cos \theta d\theta/d\beta = D_0/D \cos \beta - 2 \cos(2\beta + r - \pi/2) \quad \text{式9}$$

式5、6及び9は、

$$dx/d\beta = f \sec^2(\theta - \theta_0) \cdot \sec \theta (D_0/D \cos \beta - 2 \cos(2\beta + r - \pi/2)) \quad \text{式10}$$

であることを示唆する。すなわち、 $D_0/D \cos \beta - 2 \cos(2\beta + r - \pi/2) = 0$ であれば、 $dx/d\beta = 0$ となり、これは、

$$D_0/2D \cos \beta = \cos \alpha \quad \text{式11}$$

に相当する。

このように、ブレーズされた回折格子26は、多色光のビームと反射回折格子24とが成す角度の変化の影響をできる限り少なくするために、 D 及び α の値が式11を満たすように構成され且つ配置されなければならない。

第2図には、別の好ましい構成が示されている。この場合、第2の発光ダイオード32がNdYAG等の希土類が添加された結晶フィルタ34と共に設けられる。このフィルタは、関心周波帯の中で良好なリッチパターンを形成するように明確に規定された吸収特性を有し、パターンのノッチの波長は一定であり、また、ノッチの存在は反射回折格子24の表面の吸収特性とは無関係であるので、結晶フィルタ34により発生されるノッチパターンを計器の校正のために使用することができる。

校正ノッチを監視するために反射回折格子24の表面を表面プラズモンモードで使用する必要がないので、結晶フィルタ34からの光は、反射回折格子24の表面により分析用のブレーズされた回折格子26に向かって単純に反射されるように、発光ダイオード10からの光の偏光面に対して直ちに偏向されれば良い。

結晶フィルタ34が関心周波帯の中で2つの明確に規定されたノッチを発生するならば、2つの既知の波長で発生するノッチによって、任意の波

長に関してアレイに沿った絶対位置を決定できるばかりでなく、フォトダイオード間隔ごとの波長変化を決定することもできるので、フォトダイオードアレイ30の完全な校正を実施することが可能である。

第2図に示される装置は、通常、校正用の発光ダイオード32が動作されている間に反射回折格子24の基準領域が所定位置にあり、次に、試験領域が所定位置に配置された後に再び発光ダイオード32が動作されるように動作する。いずれの場合も、校正後、発光ダイオード32をオフし、反射回折格子24の表面からの光の分析を実行可能とするように、発光ダイオード10をオンすることができる。

さらに別の好ましい実施例が第3図に示されているが、この場合は、LED10の代わりに、白熱電球46が使用され、第2の光源は、白熱電球42及び44と、波長フィルタ38及び40と、ビームスプリッタ36とから構成される。波長フィルタ38及び40は、関心周波帯の中で良好なノッ

チパターンを発生する異なる、明確に規定された吸収特性を有する。上述の実施例の場合と同様に、波長フィルタ38及び40により発生されるパターンは一定であり、反射回折格子24のパラメータとは無関係であるので、この第2の光源を使用して装置を校正することができる。

校正方法は、白熱電球44及び波長フィルタ40により発生される校正ノッチと、白熱電球42及び波長フィルタ38により発生される校正ノッチとが、それぞれ、互いに無関係に発生されても良いことを除いて、第2図に示される実施例に関して説明した通りである。すなわち、たとえば、動作中に、白熱電球42と波長フィルタ38を使用してフォトダイオード30のアレイにより検出される既知の波長の第1の校正ノッチを発生し、次に、白熱電球44と波長フィルタ40を使用してフォトダイオード30のアレイにより検出されるべき既知の波長の第2の校正ノッチを発生することは可能であろう。これら2つの既知の波長のフォトダイオード30のアレイ上の位置が決

定されていれば、反射回折格子24上で表面プラズモン共鳴(SPR)を励起するために白熱電球46が点灯されたときに、吸収光の波長の絶対値を決定することができる。

しかしながら、校正ノッチを監視するために反射回折格子24上でSPRを励起する必要はないので、白熱電球42及び44からの光を白熱電球46からの光に対して直角に偏光しても良い。これは、校正ノッチパターンが反射回折格子24におけるSPRにより発生する吸収によって複雑にならないという点で有利である。

第4図(a)及び第4図(b)は、白熱電球42及び44がそれぞれ動作されており且つ試験用格子の基準領域が所定位置にあるときのフォトダイオードアレイの出力を示す。曲線あてはめアルゴリズムを使用すると、フィルタノッチ最小値は、それぞれ、81.81ピクセルと、225.71ピクセルで現われることがわかる。

第4図(c)は、白熱電球46が動作されたときの試験用格子の基準領域のプラズモン共鳴スペ

クトルを示す。SPRは9.37ピクセルで起こる。校正ノッチフィルタ最小値が767nm及び830nmの波長であると仮定すれば、この校正により、共鳴最小値は735.29nmにあることがわかる。

第5図(a)及び第5図(b)は、第2の発光ダイオード32が動作され、試験用格子の試験領域が所定位置にあり且つ抗体/抗原の相互作用が起こったときのフォトダイオードアレイの出力を示す。この場合、フィルタノッチ最小値は81.74ピクセルと、225.72ピクセルでそれぞれ現れることがわかる。

第5図(c)は、関連するプラズモン共鳴スペクトルを示すが、最小値は739.69nmの共鳴最小値に相当する19.33ピクセルにあることがわかる。すなわち、試験領域における抗体と抗原との結合を示す4.40nmのプラズモン共鳴シフトが起こったことになる。

本発明の一実施例によれば、

1) 少なくとも λ_1 から λ_2 までの連続する波長スペクトルを有する偏光のビームを発生する光源

と、

2) 試験すべき反射回折格子に入射する、直径の小さい回折制限平行ビームを発生する第1のレンズ手段と、

3) 反射回折格子により反射された光を受取るブレースされた回折格子と、

4) ブレースされた回折格子により反射される光のそれぞれの成分の波長が直線フォトダイオードアレイに沿ったその位置を決定し、且つアレイの長さが2つの波長 λ_1 、及び λ_2 により決定される位置の範囲を十分に包含するように反射光を多素子直線フォトダイオードアレイに集束する第2のレンズ手段と；

5) 反射回折格子の異なる領域を反射面として作用させるために、光ビームと反射回折格子との間に相対運動を成立させる手段と、

を具備し、反射回折格子の吸収波長 λ_1 は λ_1 から λ_2 の範囲内にあるため、波長 λ_1 の光はブレースされた回折格子に入射する光には含まれておらず、従って、直線フォトダイオードアレイに入

射する光のスペクトルにも含まれていない、1つ又は複数のフォトダイオードには光が入射されず、直線フォトダイオードアレイのそれぞれの素子の信号出力を決定することにより、どの素子に光が入射されていないかを検出し、校正により、反射回折格子の表面で吸収された光の波長を決定する手段が設けられる、反射回折格子の表面における材料の薄い被覆膜の有無を検出する装置が提供される。

次に記載する実施例は本発明の方法と、その試験的使用の結果とを示す。

例1 校正ノッチの作用

メタライズ回折格子の製造

射出成形によりポリカーボネート回折格子(ピッチ=633nm、深さ=30nm)を製造した。格子の凹凸面に厚さ10nmのクロム層を真空蒸着により形成した。この層は、格子構造への金の層の接着を助長する機能を有するが、表面ピラズモン共鳴の発生には全く無関係である。次に、クロム層の上面に同様に真空蒸着技術により厚さ90nmの金

の膜を形成した。

SPR吸収の位置の測定

メタライズ回折格子を第3図に示すような構成要素から成る装置の中に配置した。49枚の格子のそれぞれについて8つのゾーンを次の方法に従って順次読取った：

格子を校正用の波長フィルタ38(最小の光の強さは767nm)を通した光で照明した。

格子を校正用の波長フィルタ40(最小の光の強さは830nm)を通した光で照明した。

SPR吸収の位置の測定を可能にするため、格子を白色光で照明した。

いずれの場合も、反射光の強さが最低になる位置をフォトダイオードアレイ上のピクセル位置として記録した。反射光の強さが最低になる点の正確な位置を曲線あてはめアルゴリズムを使用して計算した。

校正ノッチピクセル位置により、検査すべき格子の特定のゾーンへの光の実際の入射角に関して、フォトダイオードアレイを校正することができ、

従って、装置内における格子のアライメントミスによるSPR吸収の位置のばらつきを補償することができた。

結果

49枚の格子に関するこのような測定から得られたデータを第1表に示す。修正前と修正後のSPR吸収の位置の変動係数(すなわち、それぞれ、ピクセル位置と波長値)からわかるように、SPR吸収の位置の測定における誤差は大幅に減少している。

第1表

	ノッチ1 の位置 (ピクセル)	ノッチ2 の位置 (ピクセル)	異常の 位置 (ピクセル)	異常の 位置 (nm)
平均	74.00	223.96	10.74	736.67
標準偏差	1.45	1.35	2.08	0.91
変動係数	1.96%	0.60%	19.40%	0.12%
範囲	12.25	10.28	12.06	5.83
以下余白				

例2 校正ノッチを使用する試験におけるインフルエンザウイルスの検出

試薬の準備

メタライズ回折格子を前述のように製造した。インフルエンザウイルスの血球凝集反応に対するマウスの単クローン抗体を通常通りに形成し、腹水から親和性クロマトグラフィーにより精製した。マウスの多クローン抗IgG抗体はロンドンのシグマ化学会社(Sigma Chemical Company, London)より入手した。標準的な方法(たとえば、E.H. Lennette, N.J. Schmidt 共編「Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections」第5版、American Public Health Association(ワシントンDC)、1979年刊を参照)を使用して、インフルエンザA型ウイルスを鶏卵に培養した。

試験を実施する方法

メタライズ回折格子を校正ノッチを含む分光計装置であらかじめ読取り、その後、抗インフルエンザ抗体又は抗IgG抗体のいずれかの抗体を吸着に

よりメタライズ回折格子に固着させた。抗体はリン酸塩緩衝塩水(PBS)(0.9%のNaClを含有する50mMの PO_4^{3-} pH 7.4)の中で100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度とされた。250 μl のこの溶液(抗インフルエンザ又は抗IgG抗体)を回折格子に様に塗布し、37℃で30分間温置した後、回折格子をPBS(6回)と、0.05% W/Vの洗浄剤Tween 20を含有するPBS(PBST)(3回)と、カゼイン加水分解物(0.1% W/V)を含有するPBS(3回)とにより洗浄した。余分の液体を格子から除去し、格子(抗インフルエンザ又は抗IgG抗体で被覆されている)にピペットで希釈ビールスを与え、その後、37℃で30分間温置した。2回の温置中は、溶液が乾燥することのないように注意した。

2回目の温置中に、格子をPBST(6回)と、PBS(6回)と、脱イオン蒸留水(6回)とにより洗浄した。次に、格子をティッシュに排水させながら半ば直立した位置で乾燥させ、37℃で20分間放置した。前述のように、格子を最初の読取りと同じ順序で読取った。これにより、格子

への抗体の吸着と、ビールスと抗インフルエンザ抗体との特定の相互作用とに起因するSPR吸収の位置のシフトを測定し、抗IgG抗体で被覆された格子により測定されるような回折格子へのビールスの不特定結合から識別することができる。

結果

それぞれの点を3つのスライドの平均として計算している第6図に示す結果は、試験条片におけるインフルエンザウイルスと抗インフルエンザ抗体との結合についてSPR吸収の位置のシフトが存在し、このシフトは、ビールスと抗IgG抗体被覆格子との不特定結合によるSPR吸収のシフトよりはるかに大きいことを明瞭に表わしている。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明による装置の一実施例を示す図、

第2図は、本発明による装置の第2の実施例を示す図、

第3図は、本発明による装置の第3の実施例を示す図、

第4a図、第4b図及び第4c図は、試験用格子の基準領域が第3図の装置を使用して検査される場合のフォトダイオードアレイの出力を示す図、

第5a図、第5b図及び第5c図は、試験用格子の試験領域が第3図の装置を使用して検査される場合のフォトダイオードアレイの出力を示す図、

第6図は、本発明による装置を使用して実施された試験の結果を示すグラフ、及び

第7図は、反射回折格子における入射角の変化の影響をできる限り小さくするように、ブレースされた回折格子をどのように構成し且つ配置すれば良いかを判定するために使用される座標系を示す図である。

- 10 … 発光ダイオード、
- 12 … 偏光装置、
- 18 … レンズ、
- 22 … 回折制限平行ビーム、
- 24 … 反射回折格子、
- 26 … ブレースされた回折格子、
- 28 … 第3のレンズ、
- 30 … フォトダイオード、

- 32...第2の発光ダイオード、
 34...希土類が添加された結晶フィルタ、
 36...ビームスプリッタ、
 38, 40...波長フィルタ、
 42, 44, 46...白熱電球。

特許出願人

アレクサンダー・セロノ・リサーチ・アンド
 ディベロップメント・リミティド
 パートナースhip

特許出願代理人

弁理士 青木 朗
 弁理士 西 銘 和 之
 弁理士 石 田 敬
 弁理士 中 山 恭 介
 弁理士 山 口 昭 之
 弁理士 西 山 雅 也

図面の添付(内容に変更なし)

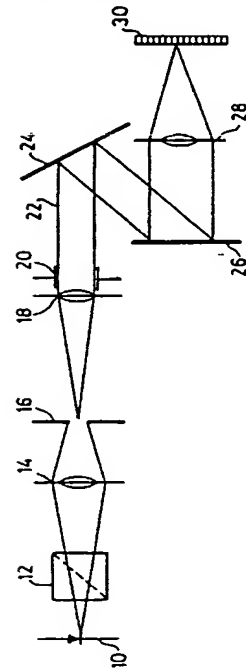


Fig. 1

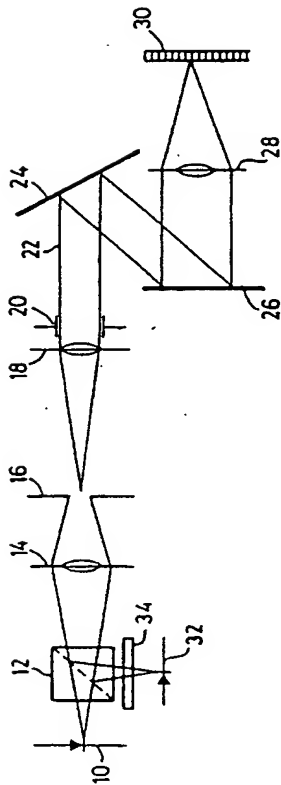


Fig. 2

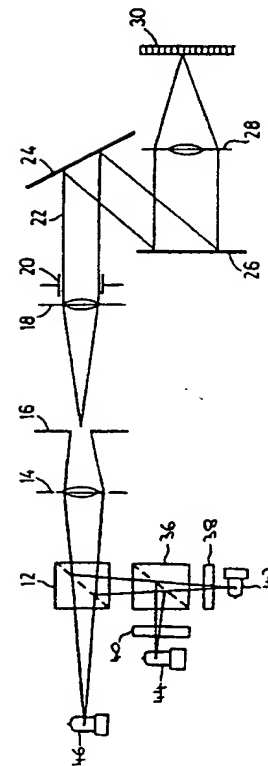


Fig. 3

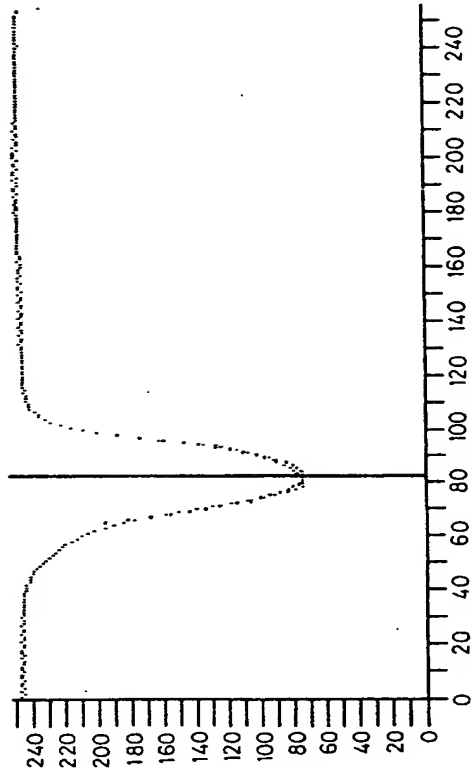


Fig. 4a

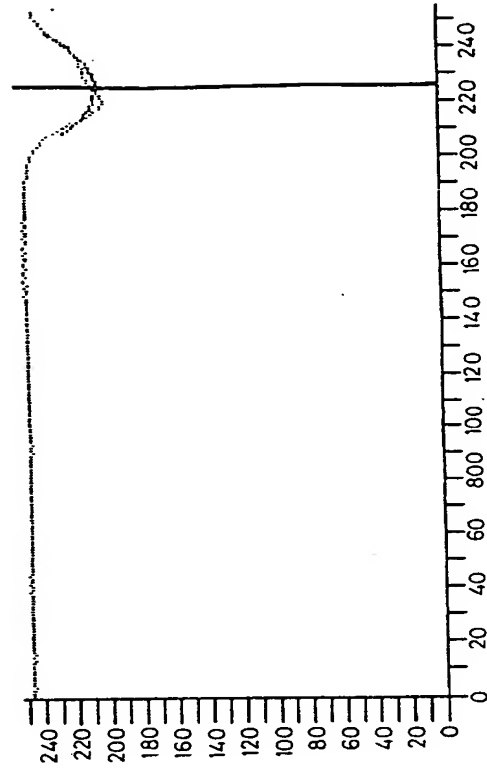


Fig. 4b

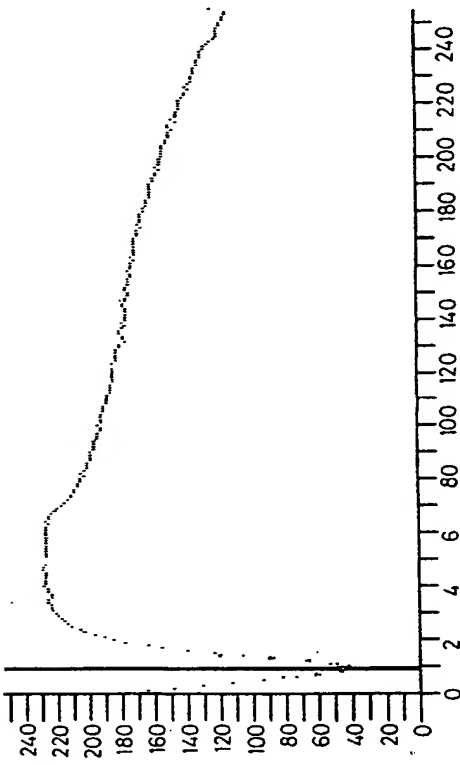


Fig. 4c

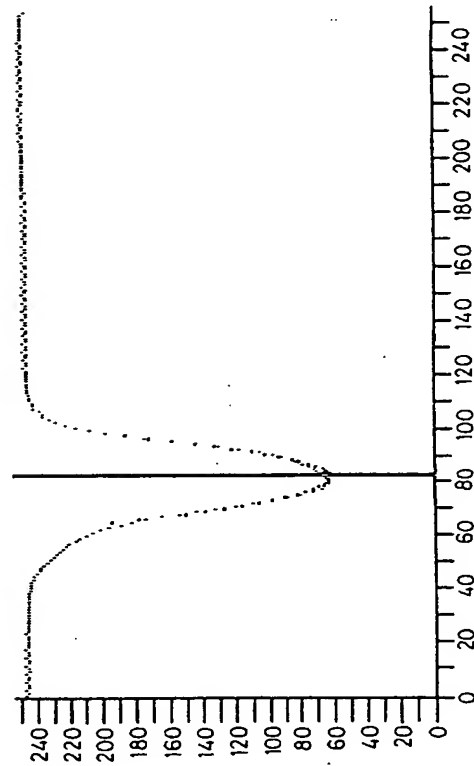


Fig. 5a

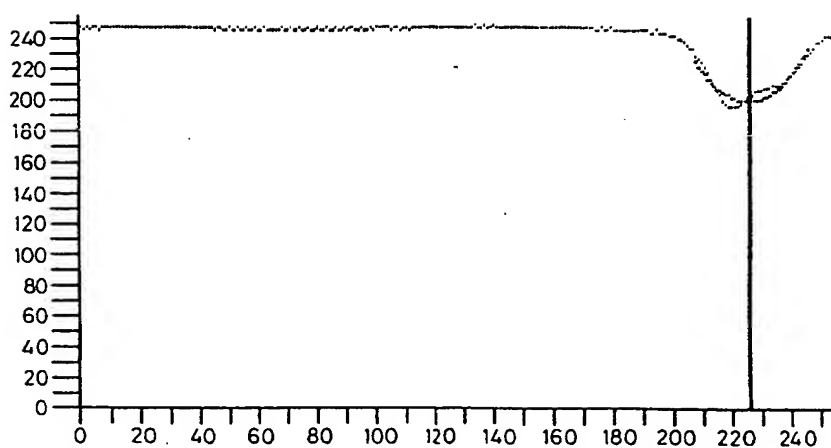


Fig.5b



Fig.5c

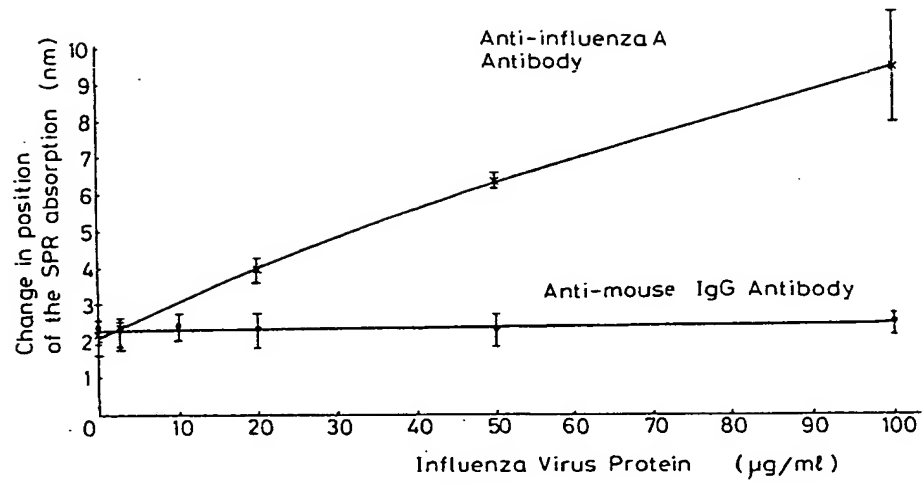


Fig.6

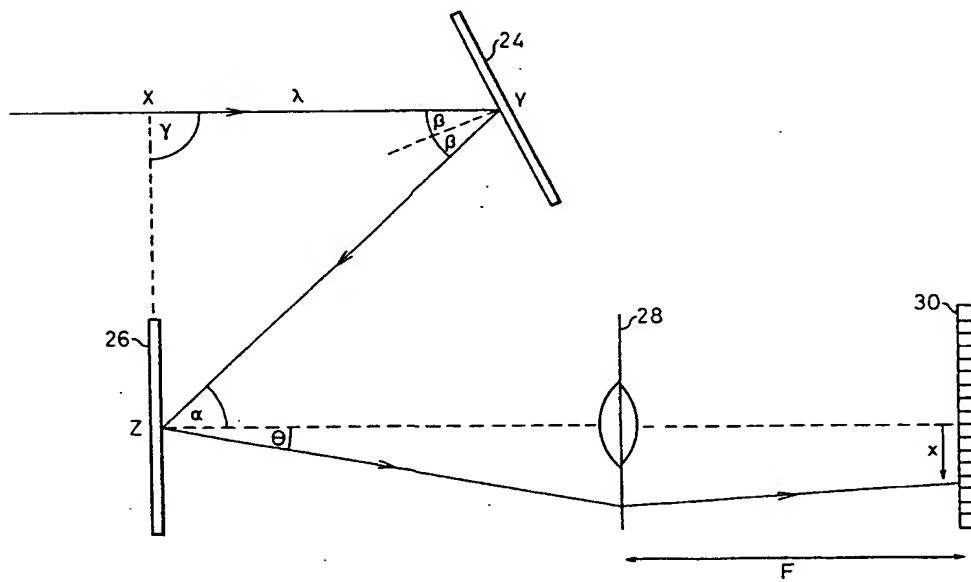


Fig.7

手続補正書(方式)

昭和62年10月20日

特許庁長官 小川 邦夫 殿

1. 事件の表示

昭和62年特許願第184701号

2. 発明の名称

スペクトル分析方法及び装置

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 アレス-セロノ リサーチ アンド
ディベロプメント リミティド
パートナーシップ

4. 代理人

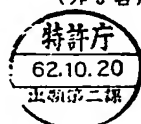
住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号
静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士(6579) 青木 朗
(外5名)



5. 補正命令の日付

自発補正



手続補正書(自発)

昭和62年10月20日

特許庁長官 小川 邦夫 殿

1. 事件の表示

昭和62年特許願第184701号

2. 発明の名称

スペクトル分析方法及び装置

3. 補正をする者

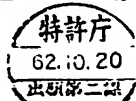
事件との関係 特許出願人

名称 アレス-セロノ リサーチ アンド
ディベロプメント リミティド
パートナーシップ

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号
静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士(6579) 青木 朗
(外5名)



6. 補正の対象

- (1) 明細書
(2) 図面

7. 補正の内容

- (1) 明細書の浄書(内容に変更なし)
(2) 図面の浄書(内容に変更なし)

8. 添付書類の目録

- (1) 浄書明細書 1通
(2) 浄書図面 1通

5. 補正の対象

図面(Fig 6)

6. 補正の内容

図面(Fig 6)を別紙の通り補正する。

7. 添付書類の目録

図面(Fig 6) 1通

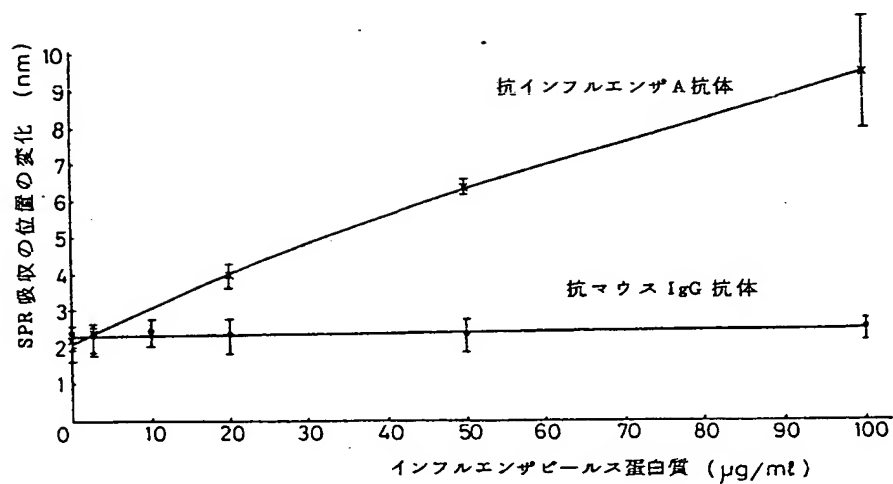


Fig.6